

A D45948 OTKA posztdoktori pályázat szakmai zárójelentése

Témavezető neve: **Müller Viktor Dr.**

Vezető kutató neve: Szathmáry Eörs Dr.

Téma címe: Modellezés a HIV-fertőzés kutatásában és az immunológiában

A pályázat futamideje: 2003. október 1. – 2006. szeptember 30.

A pályázat keretén belül végzett munkám során a HIV-fertőzéshez köthető témákat vizsgáltam matematikai és bioinformatikai eszközökkel. A konkrét kutatási témákat a friss felfedezések, illetve a kutatási együttműködésben hozzáférhető adatok motiválták. Ennek megfelelően az eredeti konkrét célkitűzésektől bizonyos mértékig eltértem, de a főbb tárgykör megfelel a pályázat eredeti tervének.

I. Publikált eredmények

1. Hipermutációs mechanizmus hatása a vírusok kodonhasználatára: összehasonlító genomanalízis

A *humán immundeficiencia vírus* (HIV) vizsgálata során forradalmian új molekuláris mechanizmust tártak fel, amely a veleszületett védekezőrendszer részeként a retrovírusokkal veszi fel a harcot. Ez a felfedezés motiválta ezt a bioinformatikai jellegű munkámat. A főemlősök és rágcsálók immunsejtjeiben működő APOBEC3 fehérjecsaldó guanin→adenin (G→A) hipermutációt indukál a HIV-ben és más retrovírusokban. Ezt a hatást a HIV és közeli rokonainak Vif fehérjéje képes gazdafajra specifikusan kivédeni. A hipermutáció gátlása azonban az APOBEC3 és Vif fehérjék relatív dózisától függ, így feltételezhető, hogy nem mindig száz százalékos. A várakozás szerint a megemelt rátájú G→A pontmutációnak egyéb hatás hiányában el kellene tolnia a G:A arányt azokban a nukleotid-pozíciókban, ahol ez a csere nem okoz aminosav-változást, azaz a mutáció *szinonim*. A szinonim mutációk az aminosav-sorrend és így a fehérjeevolúció szempontjából semlegesek, így csak a mutációs ráták és a közvetlenül a nukleotid-sorrendre ható szelekciós erők befolyásolhatják a szinonim kodonok használatát.

Az összes ismert retrovirális genom kodonhasználatát elemezve azt vizsgáltam, hogy a G→A irányú mutációs nyomás hatása felfedezhető-e a szinonim kodonpárok használatában. Megállapítottam, hogy noha a legtöbb retrovírus kodonhasználatában G→A irányú torzulást mutat (elsősorban az adenin magas aránya miatt), a torzulás mintázata a taxonok között nem korrelál az APOBEC3 fehérjék jelenlétével a gazdafajban, illetve Vif jelenlétével a vírusban. Ez arra utal, hogy a G→A irányú torzulás kialakításában az APOBEC-Vif rendszer nem játszik döntő szerepet. A negatív eredményt két további vizsgálattal is megerősítettem, amelyek az APOBEC enzimsaldó szubsztrátspecifitására épültek. Kísérletekkel kimutatták, hogy a hipermutáció rátája erősen függ az adenin nukleotidot követő két szomszédos pozíció nukleotidjaitól (kontextuspreferencia). Statisztikai vizsgálattal megmutattam, hogy a retrovírusok és hepadnavírusok csoportjában (amelyek az APOBEC3 enzimsaldó természetes célpontjai lehetnek) a G→A torzulás mintázata nem követi az APOBEC3 enzimek ismert kontextuspreferenciáját. Ismert továbbá, hogy az APOBEC3 enzimek elsősorban egyszálú DNS-re hatnak, ami a retrovírusok életciklusában a negatív szál módosítását teszi lehetővé. A mechanizmus a citozin deaminációja uracillá, amely azután a pozitív szál szintézisékor a citozin eredeti guanin komplementere helyett adeninnel párosodik. Az APOBEC-indukálta hipermutáció így a pozitív szálon kizárólag a G→A kicserélődések rátáját növeli. Kimutattam azonban, hogy a retrovírusokban a G→A torzulás nagyon erős korrelációt mutat a C→T torzulással, ami arra utal, hogy a kétféle torzulást közös, mindkét DNS-szára ható mechanizmus hozza létre (ami ez alapján lehet akár G→A, akár C→T, akár mindkét irányú mutációs vagy szelekciós nyomás). A három független eredmény (taxonómiai korreláció, kontextuspreferencia és szálspecifitás hiánya) együttesen erős bizonyítékot adnak arra, hogy az APOBEC3 indukálta

hipermutációs mechanizmus nem játszik jelentős szerepet a retrovírusok kodonhasználatának kialakításában.

A magasabb szintű összehasonlítás kedvéért az elemzést valamennyi hozzáférhető vírusgenomon elvégeztem (1115 faj). Az összehasonlítás alapján a G→A torzulás a reverz transzkripciót használó retroid vírusok (retrovírusok, hepadnavírusok és a növényi kaulimovírusok) általános és jellemző sajátsága. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy a megnövekedett G→A (és/vagy C→T) pontmutációs ráta a reverz transzkripció általános sajátsága lehet. Alternatív (vagy kiegészítő) magyarázat, hogy a hipermutációs mechanizmusból fakadó mutációs nyomás hatását felülírja és ezáltal elfedi egy nála erősebb, a szinonim kodonokra ható szelekciós erő – ebben az irányban tovább folytatom a vizsgálódást.

A kutatás eredményei rangos folyóiratban jelentek meg [1].

2. A virulencia evolúciója a Svájci HIV Kohorszban

A humán immundeficiencia vírus evolúciós időskálán rendkívül fiatal: a becslések szerint körülbelül hetven évvel ezelőtt jöhetett létre a csimpánzok immundeficiencia vírusának „átugrásával” az emberi fajra. A rövid evolúciós múlt felveti annak a lehetőségét, hogy a vírus adaptációja az új gazdaszervezethez jelenleg is folyik. A lehetőséget megerősíti, hogy a retrovírus kórokozó mutációs rátája igen magas, és minden megfertőzött betegben nagy számú replikációs ciklust végez. A lehetséges evolúció talán legfontosabb aspektusa, hogy a vírus betegségkórokozó képessége, azaz virulenciája, evolválódik-e magasabb vagy alacsonyabb szint felé. Ez a kérdés kétféleképpen vizsgálható. Elméleti számítások segítségével a virulencia és a fertőzőképesség kapcsolatára vonatkozó adatokból becsülhető, hogy a vírus számára milyen mértékű virulencia optimális, illetve hogy ez alatta vagy felette van-e a jelenleg tapasztalt értékeknek. Másfelől hosszú távú járványtani adatok alapján megvizsgálhatjuk, hogy a rendelkezésre álló megfigyelések időtartama alatt bekövetkezett-e a virulenciában észlelhető tendenciózus változás. Én az utóbbi lehetőséget követtem. A pályázat keretében végzett kutatás a Svájci HIV Kohorsz (Swiss HIV Cohort Study) adatainak felhasználásával vizsgálta, hogy a svájci AIDS-járvány két évtizedében megfigyelhetőek-e olyan időbeli trendek, amelyek a virulencia evolúciójára utalhatnak. A vizsgálathoz szükséges adatokhoz tudományos együttműködés keretében fértem hozzá. A kohorsz 1983-tól rögzítette összesen több mint 13 ezer HIV-fertőzött páciens főbb klinikai és demográfiai paramétereit.

A virulencia legfontosabb mércéje végső soron az, hogy a betegek a megfertőződéstől számítva – kezelés nélkül – mennyi idő alatt jutnak el a tünetekkel járó AIDS-stádiumba, illetve a végstádiumban bekövetkező haláláig. Szerencsére ez a mérőszám nagyon gyakran nem áll rendelkezésre: egyrészt a betegség lefolyása még gyógyszeres kezelés nélkül is nem egyszer annyira hosszú, hogy a kohorsz időtartama alatt megfertőződött betegek még nem jutottak el az AIDS-stádiumba; másrészt pedig a hatékony gyógyszerek feltalálása (1995) óta a kezelések segítségével a legtöbb esetben megakadályozható az AIDS-stádium kialakulása. A virulencia jellemzésére ezért három kiegészítő mérőszámot alkalmaztam az egyes betegekben. A betegség előrehaladásának (*betegségprogresszió*) ütemét jelzi a CD4+ T-sejtek szintjének csökkenése a vérben, amit rendszeres mérésekkel követnek nyomon. Az egyes betegek CD4 adatsorából becsültem a sejtek fogyási rátáját. Második mérőszámként a CD4:CD8 arány csökkenési rátáját alkalmaztam, mivel ez kiküszöböli a limfocitaszám rövid távú ingadozásainak hatását. Végül harmadik mérőszámként a vérbeli vírusszint (logaritmált) átlagát tekintettem, amiről korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy fontos előrejelzője a betegségprogresszió sebességének. Az elemzésből kizártam azokat az adatpontokat, amelyeket az adott beteg gyógyszeres kezelésének megkezdése után rögzítettek, valamint azokat, amelyek a betegség kezdeti vagy végstádiumából származhattak. Azokat a pácienseket vizsgáltam, akikből az adatszelekció után elegendő adatpont állt rendelkezésre az egyes mérőszámok megbízható becsléséhez (a részleteket lásd a publikációban [2]), továbbá az analízist a kohorszban rögzített etnikum és nemzetiség alapján igyekeztem a helyi (svájci, nem friss bevándorló) betegcsoportra korlátozni. A kritériumoknak megfelelő betegek mintáján lineáris regressziós modellel vizsgáltam, hogy a három

mérőszám változott-e a járvány két évtizede alatt, azaz a mérőszámok mutatnak-e korrelációt a megfertőződés becsült időpontjával. A regressziós modellben a fertőződés időpontja mellett további folytonos (életkor, kezdeti CD4-sejtszám) és kategorikus (nem, rizikócsoporthoz) faktorokat is figyelembe vettem. A statisztikai vizsgálat alapján egyik mérőszám sem mutatott korrelációt a megfertőződés időpontjával, azaz a virulencia alakulásában nem észleltem hosszú távú tendenciát, ami irányított szelekcióra, tendenciózus evolúcióra utalhatna.

Ez az eredmény kétféleképpen értelmezhető. Elképzelhető, hogy a virulencia változik ugyan, de lassabban, semhogy két évtized alatt kimutatható volna. A HIV gyors mutációs rátája ellenére lassú evolúciót eredményezhet például, hogy a vírusra ható szelekció fő színtere a szervezetben belüli kompetíció lehet, ami gyengíti az átadódásra, és így a virulenciára ható szelekciót. Az alternatív magyarázat pedig az, hogy a vírus már elérte a virulencia optimális szintjét, azaz a jelenlegi magas szint evolúciósan stabil. Egy angol kutatócsoport nem publikált eredményei (amelyek a vírusszint és a fertőzőképesség, illetve a várható élettartam közötti összefüggésekre épülnek) ezt az elképzelést támogatják. Végül elképzelhető, hogy a két alternatíva hosszabb evolúciós időskálán összekapcsolható: lehetséges, hogy a virulencia jelenlegi szintje lokális optimumot jelent, amire rövid távon stabilizáló szelekció hat, hosszú távon viszont elérhető egy ettől eltérő globális optimum.

Az eredmények gyakorlati jelentőséggel is bírnak. Arra utalnak, hogy – a klasszikus nézeteken alapuló várakozással szemben – nem várhatjuk, hogy az AIDS-járvány „magától” megszelídüljön, legalábbis évtizedes skálán nem. A vizsgálatot rangos folyóiratban publikáltuk [2].

3. Az integrációs hipotézis: elmélet a SIV-vírusok és gazdafajaik evolúciójáról

Részben az előző munka motiválta, hogy a SIV (*simian immunodeficiency virus*: majom immundeficiencia vírus) vírusok és gazdafajaik koevolúciójára vonatkozó elképzeléseimet egységes elméletté fogjam össze és közöljem [3]. Az emberi HIV vírusok a SIV rokonsági körbe tartoznak: a HIV-1 fő típusa a csimpánzok, a HIV-2 típusai a kormos mangabék SIV vírusából alakultak ki. Az AIDS-kutatás egyik intenzíven vizsgált iránya, hogy a SIV vírusok természetes gazdafajai (eddig 30-40 afrikai majomfaj fertőzöttsége ismert) miért nem betegszenek meg: a legtöbb „természetes fertőzés” tünetmentes. Különösen érdekes, hogy a természetes fertőzések általában magas vérbeli vírusszinttel járnak: ehhez mérhető vírusszint HIV-fertőzött emberekben agresszív, gyors lefolyású betegséggel párosul. Ebből világosan kiderül, hogy a HIV-fertőzés patológiája nem a magas szintű vírustermelés közvetlen és elkerülhetetlen következménye, hanem valamilyen közvetett hatáshoz köthető. A természetes gazdafajok pedig nem úgy kerülnek el a megbetegedést, hogy erős immunválasszal kordában tartják a vírus replikációját, hanem a közvetett hatást sikerült kiküszöbölniük. Jelenlegi ismereteink szerint ez a közvetett hatás az immunrendszer kóros, általános hiperaktivációjához köthető, amit a vírus jelenléte vált ki, és a nem fertőzött immunsejteket is érinti. A hiperaktiváció közvetlen determinánsának megtalálása óriási segítséget jelenthetne a HIV-fertőzés kezelésében, gyógyításában. Úgy tűnik, hogy a SIV-majom koevolúció során nem a vírusok veszítették el ezt a determinánst, hiszen többféle SIV vírus átvitele többféle, SIV-hez nem adaptálódott gazdafajba a jelek szerint kivétel nélkül AIDS-jellegű betegséghez vezet (SIVcpz átvitele emberre, SIVsm átvitele emberre és ázsiai makákókra). Valószínűbb, hogy a gazdafajok alkalmazkodtak: az immunrendszer veszítette el reagálóképességét a hiperaktiváció determinánsára. A reagálóképesség lehet T-sejt/B-sejt receptor függő vagy azoktól független. Az előbbi eshetőségre javasolok evolúciós forgatókönyvet.

A HIV/SIV vírusok a retrovírusok közé tartoznak, amelyek DNS-sé átírt genomjukat beleillesztik a megfertőzött gazdasejt genomjába. A retrovírusok általában meghatározott sejttípusokat fertőznek (a SIV vírusok elsősorban CD4+ T-sejteket és makrofágokat), de a különféle emlősök (például az ember) genomjában talált retrovirális eredetű szekvenciák azt bizonyítják, hogy a retrovírusok esetenként a csíravonalba is bekerülhetnek. Ez a lehetőség a SIV vírusok esetében sem kizárható, ami viszonylag

egyszerű evolúciós utat kínálhat az immunrendszer hiperaktivációjának elkerülésére. A SIV genom integrációja után az immunrendszer hiperaktivációjáért felelős génfragment megfelelő promóterekkel kifejeződhet a limfociták negatív szelekciója során (a csecsemőmirigyben, illetve a csontvelőben), ami így a determinánst felismerő limfocitákat is kiszelektálja, megakadályozva a kóros immunválasz kialakulását. Az elmélet ellenőrizhető predikciója, hogy a SIV vírusokhoz alkalmazkodott majomfajok genomjában jelen kell lennie olyan SIV eredetű fragmenteknek, amelyek kifejeződnek a negatív szelekció színhelyein. E fragmentek azonosítása a HIV-fertőzés patogenezisének megértését is elősegítené.

Az elmélet egyelőre természetesen nem több mint egy érdekesítő lehetőség, amely kísérleti megerősítésre vár. Jelen tudásunk szerint az sem kizárható, hogy az immunrendszer hiperaktivációja a T- és B-sejtek receptorspecifitásától független mechanizmuson alapszik, ami kizárná az integrációs hipotézis evolúciós forgatókönyvét. Bízom benne, hogy a szabadon hozzáférhető nemzetközi publikáció ösztönözní fogja a kérdés eldöntéséhez szükséges kísérleti munkát.

II. Publikálásra benyújtott eredmények

I. Gyógyszer-rezisztenciát adó mutációk fitneszhatásának becslése

Kutatási együttműködés keretében korábbi módszerek felhasználásával és továbbfejlesztésével becslést adtam egy különleges gyógyszerrezisztens HIV-mutáns *in vivo* fitneszelőnyére. A reverz transzkriptáz génben inszerciót tartalmazó mutáns reverztranszkriptáz-gátlóval is kezelt páciensben jelent meg, fokozatosan kiszorítva a korábbi domináns vírusváltozatot. A mutáns gyakoriságát rögzítő idősor alapján a mutáns fitneszelőnyét 2-3%-ra becsültem a vírusszint ingadozását is figyelembe vevő módszerrel. A kísérletes partner *in vitro* vizsgálatokkal megerősítette, hogy bizonyos gyógyszerkoncentráció felett az inszerciós mutáns valóban hatékonyabbá válik a „vad típus”-nál. A különleges mutánst leíró cikk jelenleg a *Virology* című folyóiratnál áll elbírálás alatt.

Marleen C.D.G. Huigen, Loek de Graaf, Dirk Eggink, Rob Schuurman, Viktor Müller, Anna Stamp, David K. Stammers, Charles A.B. Boucher and Monique Nijhuis: Evolution of a Novel 5 Amino Acid Insertion in the β 3- β 4 Loop of HIV-1 Reverse Transcriptase (benyújtva)

III. Lezáráshoz közeli eredmények

I. A gyógyszerrezisztencia kialakulásában részt vevő mutációk azonosítása a HIV proteáz génjének hasítási helyeiben

Kornai Júliával és egy németországi csoporttal együttműködésben kerestünk olyan mutációkat, amelyek a rezisztenciában fontos proteázmutációkkal a véletlen eloszlás szerint vártnál gyakrabban fordulnak elő együtt (kovariációanalízis), azaz az enzim aktivitását helyreállító kompenzációs mutációk lehetnek. A vizsgálódás körét a proteáz enzim hasítási helyeire szűkítettük le, az analízist pedig a Los Alamos adatbázisból szabadon letölthető szekvenciákon végeztük. Az adatok hét hasítási hely vizsgálatát tették lehetővé, ezek a következők voltak: NC/p1, p1/p6gag, NC/TFP, TFP/p6pol, p6pol/PR, PR/RTp51 és RTp51/RTp66. A hasítási helyek pozíciói, illetve a proteáz enzim pozíciói közötti kapcsoltságot khí-négyzet próbával teszteltük. 41 olyan pozíciópárt találtunk, amelyekre a teszt szignifikáns kovariációt mutatott, és a korrelációs koefficiens abszolút értéke meghaladta a 0,2-et. 23 pozíciópár mutatott pozitív korrelációt, ami felveti annak a lehetőségét, hogy az érintett hasításihely-pozíciók részt vehetnek a rezisztencia kialakulásában. 18 pozíciópár negatív korrelációt mutatott, jelezve, hogy a mutáns proteáz enzim a vad típusnál is kevésbé tolerálja a hasítási helyek érintett mutációit. Jelenleg (egy bírálói vélemény nyomán) további kiegészítő munka folyik az olyan típusú „hamis pozitív” eredmények kizárására, amelyekben a kovariáció csupán közös leszármazás, nem pedig funkcionális kapcsolat

eredménye. Ilyen hamis pozitív eredményt kaphatunk, ha egy sok szekvenciával reprezentált közeli rokon szekvenciahalmaz funkcionálisan semleges mutációpárokat tartalmaz.

A pályázathoz kapcsolódó publikációk listája

1. Müller V, Bonhoeffer S. **Guanine-adenine bias: a general property of retroviral genomes that is unrelated to host-induced hypermutation.** *Trends Genet* 2005,21:264-268.
2. Müller V, Ledergerber B, Perrin L, Klimkait T, Furrer H, Telenti A, *et al.* **Stable virulence levels in the HIV epidemic of Switzerland over two decades.** *AIDS* 2006,20:889-894.
3. Müller V, De Boer RJ. **The integration hypothesis: an evolutionary pathway to benign SIV infection.** *PLoS Pathog* 2006,2:e15.